

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Mare Vahtre

**Tal1 transkriptsioonifaktori uurimiseks vajalike CRISPR-Tal1 ja „Tet-OFF“ plasmiidide
konstrueerimine**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendaja *PhD* Tõnis Org

TARTU 2018

INFOLEHT

Tal1 on transkriptsioonifaktor, millel on vererakkudes mitmeid olulisi funktsioone. Arengu käigus on Tal1 vajalik nii hematopoeetilise süsteemi tekkeks kui ka ektoopilise kardiomüogeneesi ärahoidmiseks. Samuti omab see transkriptsioonifaktor rolli ka T-rakulise leukeemia tekkimisel. Teadmised Tal1-e molekulaarsetest toimemehhanismidest on olulised erinevate terapeutiliste rakenduste arendamiseks.

Käesoleva töö eesmärgiks oli konstrueerida Tal1 valgu funktsiooni edaspidiseks uurimiseks vajalikud vahendid – CRISPR konstrukti Tal1 geeni inaktiveerimiseks ning Tal1-e ekspressiooni kontrollimiseks doksutsükliiniga indutseeritav „Tet-OFF“ süsteem, mis võimaldaksid üheskoos luua hematopoeetilise püsirakuliini antud valgu funktsioneerimise molekulaarsete mehhanismide uurimiseks *in vitro*.

Märksõnad: geeniregulatsioon, enhanserid, eRNA, Tal1

CERCS: T490 Biotehnoloogia

Tal1 is a master regulator that governs the establishment of the entire hematopoietic system and it is also critical for preventing ectopic cardiomyocyte development in hemogenic tissues. Moreover, Tal1 induces T-cell leukemia. Therefore, knowledge about the molecular mechanisms behind Tal1 functions may have broader implications in regenerative medicine.

The purpose of given theses was to construct necessary tools for further research of Tal1 – CRISPR plasmid and „Tet-OFF“ system in order to study the function and molecular mechanisms of Tal1 *in vitro* using a constructed hematopoietic cell line.

SISUKORD

INFOLEHT	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Geeniregulatsioon eukarüootsetes organismides	8
1.2. Transkriptsiooni regulatsioon	8
1.2.1. Transkriptsioonifaktorid	9
1.3. Enhanserid	10
1.3.1. Enhanser RNA-d.....	11
1.4. Geeni funktsiooni uurimise meetodid	15
1.4.1. CRISPR/Cas9.....	15
1.4.2. Tetratsükliin-kontrollitud transkriptsiooni regulatsioon.....	17
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	20
2.1. Töö eesmärgid	20
2.2. Materjalid ja metoodika	20
2.2.1. CRISPR DNA konstrueerimine ja klonimine	20
2.2.2. „Tet-OFF“ plasmidi konstrueerimine ja klonimine	23
2.3. Tulemused ja arutelu	25
2.3.1. CRISPR-Tal1	26
2.3.2. „Tet-OFF“	27
KOKKUVÕTE.....	32
TÄNUAVALDUSED	34
KASUTATUD KIRJANDUS.....	35
LISAD	41
LISA 1.....	41

LISA 2.....	42
LISA 3.....	43
LISA 4.....	44
LISA 5.....	45
LIHTLITSENTS	46

KASUTATUD LÜHENDID

CRISPR - klasterdatud regulaarsete vahedega lühikesed palindroomsed kordused; *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CRR - *cis*-regulatoorne regioon

crRNA - CRISPR-RNA

crDNA - CRISPR-DNA

DNA - desoksüribonukleiinhape

eRNA - enhanser-RNA

HDR - homoloogial põhinev rekombinatsioon; *homology directed repair*

kb - *kilo base*; aluspaaride mõõtühik (1 kb = 1000 aluspaari)

LB - lüsogeenne sööde; *lysogeny broth*

miRNA - mikro-RNA

mRNA - *messenger* RNA, informatsiooni-RNA

NELF - negatiivne elongatsiooni faktor; *negative elongation factor*

NHEJ - mitte-homoloogiline otste ühendamine; *non-homologous end joining*

PAM - protospeisseri külgnev motiiv

PCR - polümeraasi ahelreaktsioon; *polymerase chain reaction*

RE - vastuselement; *response element*

RNA - ribonukleiinhape

RNAPII - RNA polümeraas II

siRNA - lühike interferentsi RNA

sgRNA - *single guide RNA*

TALEN - transkriptsiooni aktivaatori sarnane efektor-nukleas; *transcription activator-like effector nucleases*

TBE - tris/borate/EDTA (puhver)

tracrRNA - crRNA-d transaktiveeriv RNA

tTA - tetratsükliin-kontrollitud transaktivaator

rtTA - pöörd- tetratsükliin-kontrollitud transaktivaator

ZFN - tsingi sõrme nukleas; *zinc finger nuclease*

SISSEJUHATUS

Tal1 on essentsiaalse rolliga transkriptsioonifaktor hematopoeesis, mis omab kriitilist tähtsust nii verelooma eellasrakkude arengus, täiskasvanute hematopoeetiliste tüvirakkude säilitamisel ja vaigistamisel kui ka vererakkude terminaalses küpsemises (Porcher *et al.*, 2017).

Tal1 funktsiooni molekulaarsete mehhanismide edaspidiseks uurimiseks kasutatakse CRISPR/Cas9 süsteemi, mille abil on võimalik muuta geen mittefunktsionaalseks. Kombineerides antud meetodit „Tet-OFF“ süsteemiga, on võimalik geeni avaldumist kontrolliga doksütsükliiniga. Geeni avaldumise kontrollimine on vajalik rakkudes tekkivate muutuste uurimiseks Tal1-e olemasolul ja puudumisel.

Teadmised raku identiteeti kontrollivate transkriptsioonifaktorite tööst panevad aluse regeneratiivse meditsiini rakendusvõimalustele. Seetõttu on paremad arusaamad geeniaktiivsusest, peamiste regulaatorite repressioonist ning epigeneetilistest piiridest erinevates rakutüüpides olulised efektiivsete terapeutiliste rakenduste arendamiseks (Org *et al.*, 2015).

Käesoleva töö eesmärgiks on konstrueerida kaks plasmidi, mis on vajalikud transkriptsioonifaktori Tal1-e funktsiooni ja molekulaarsete toimemehhanismide edaspidiseks uurimiseks.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Geeniregulatsioon eukarüootsetes organismides

Võrdleva genoomika abil on kindlaks tehtud, et geenide hulk organismis ei korreleeru organismide morfoloogilise ning käitumusliku keerukusega. Kõrgemate organismide kompleksus on korrelatsioonis genoomi mittekodeeriva regioonide mahuga, mis tuleneb keerukate reguleerivate radade arvust (Levine ja Tijan, 2003).

Geeniekspressioon baseerub bioloogilistele signaalidele vastamisel ning seda reguleeritakse kolmel tasandil – transkriptsioon, transkriptsioonijärgne protsessing ning translatsioon (Heinaru, 2012).

1.2. Transkriptsiooni regulatsioon

Geeniregulatsioon transkriptsiooni tasandil toimub nii eukarüootsetes kui prokarüootsetes organismides valk - DNA interaktsioonide kaudu. Transkriptsioonifaktorid seonduvad spetsiifilistele DNA piirkondadele, mille tulemusena leiab aset transkriptsiooni inhibeerimine või võimendamine (Heinaru, 2012).

Eukarüootne transkriptsioon on reguleeritud läbi kolme tasandi: esiteks DNA järjestused, millel transkriptsioonifaktorid assotsieeruvad *cis*-reguleerivate elementidega ning mille tulemusena reguleeritakse vastavat geeni; teiseks kromatiin, mis võimaldab reguleerida kromosoomi piirkondade erinevat ligipääsetavust ning seeläbi supresseerida või võimaldada geeni aktivatsiooni. Kromatiini struktuuri avatust mõjutavad remodelleerivate komplekside vastasmõjutused, histoonide modifikatsioonid, DNA metülatsioon ning mitmesugused repressioonid ning aktiveerivad mehhanismid. Transkriptsiooni kontrolli kolmandaks tasemeks on raku tuuma arhitektuur, mis hõlmab endas kromosoomi dünaamilisust ning kindlate lookuste ajalisi ja ruumilisi organisatsioone. Nimetatud asjaolude tõttu on eukarüootne transkriptsioon energiamahukas mitmetasandiline protsess, mis vajab efektiivseks koordineerimiseks mitmeid molekulaarseid sündmusi (Cremer, 2001).

1.2.1. Transkriptsioonifaktorid

Transkriptsiooni regulatsiooni eest vastutavad regulaatorvalgud ehk transkriptsioonifaktorid. Transkriptsioon on reguleeritud positiivsete ja negatiivsete regulaatorvalkude poolt (Heinaru, 2014).

Transkriptsiooni regulatsiooni spetsiifilisus sõltub transkriptsioonifaktorite interaktsioonist DNA *cis*-regulaatorsete regioonide ehk CRR-idega (Levine, 2010). CRR-is olevat järjestust, mille transkriptsioonifaktor ära tunneb, nimetatakse vastuselemendiks (RE, *response element*). Transkriptsioonifaktorite omadus seonduda spetsiifilistele vastuselementidele on võimalik tänu biofüüsikalistele interaktsioonidele DNA ning valgustruktuuri vahel (Brent *et al.*, 2008).

Spetsiifilise interaktsiooni tekkimise teeb keeruliseks asjaolu, et paljud transkriptsioonifaktorid kuuluvad suurtesse perekondadesse koos mitmete paralooigidega (Gehring *et al.*, 1994). Transkriptsioonifaktori ning korrektse regiooni seondumist võib mõjutada kromatiini ligipääsetavus, mis on reguleeritud sõltuvalt arengujärgust ja rakutüübist. Lisaks mängivad transkriptsioonifaktorite seondumise spetsiifilisuses rolli ka kõrvalolevad saidid või seondumine kromatiinile ilma DNA-ga otsest kontakti loomata. Seetõttu ei pruugi transkriptsioonifaktorid interakteeruda DNA-ga mitte ainult konsesusjärjestuse, vaid ka läbi teiste järjestuste (Brent *et al.*, 2008).

Transkriptsioonifaktorite seondumine DNA-ga on laialt levinud, kattudes mitmete genoomi regioonidega. Seondumine on kõige efektiivsem funktsionaalsete sihtmärkidega, kuid esineb ka madala efektiivsusega seondumist ehk esineb nii spetsiifilisi kui ka mittespetsiifilisi interaktsioone. Mittefunktsionaalne seondumine võib aset leida kromatiini muudele juurdepääsetavatele osadele, mis on tingitud transkriptsioonifaktorite kõrge kontsentratsioonist rakkudes (Fisher *et al.*, 2012).

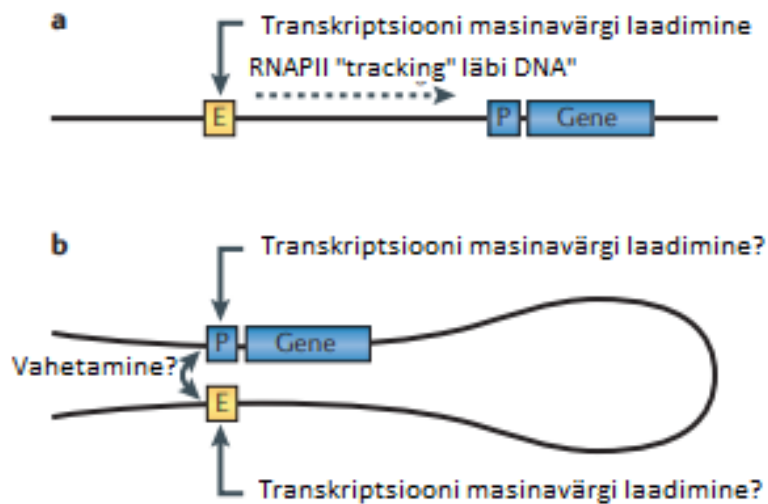
Teadagi on küll mitmete transkriptsioonifaktorite seondumiskohad, kuid selgusetud on veel kvantitatiivsed detailid spetsiifilisest äratundmismehhanismist geeniregulatsiooni kontekstis (Todeschini, Georges ja Veitia, 2014).

1.3. Enhanserid

Eukarüootsete geenide transkriptsioon on äärmiselt kompleksne protsess, mis nõuab täpset regulatsiooni läbi transkriptsioonifaktorite seondumise erinevat tüüpi reguleerijatele DNA järjestustele (Smale ja Kadonaga, 2003). Spetsiifiline geeniekspressioon on tagatud tänu *cis*-reguleerijatele elementidele, mida nimetatakse enhanseriteks. Enhanserid on lühikesed, 100 kuni 1 000 aluspaari pikkused mittekodeerivad DNA järjestused, mis aktiveerivad transkriptsiooni sõltumata nende kaugusest, paiknemisest ja orientatsioonist märklauageeni promootori suhtes (Schaffner, 2015).

Enhanserid on suures osas vastutavad rakutüübile omase spetsiifilise geeniekspressiooni eest, mis saavutatakse tänu resultatiivsele ning ka spetsiifilisele kommunikatsioonile enhanseri ja geeni promootori vahel. Enhanserite täpseks funktsioneerimiseks on vaja täita järgnevad tingimused: enhanseritele peab olema juurdepääs, mistõttu on vajalik genoomi adapteerumine lokaalse kromatiini struktuuri tasemel eksponeerimaks enhanserite transkriptsioonifaktorite seondumise motiive; enhanserid ja promootorid peavad interakteerumiseks asuma üksteise suhtes lähedal, mistõttu moodustub enhanseri ja promootori vahele ling; kromatiini ligipääsetavus ja kromatiini kõrgem organisatsioon, mis on määratud rakutüübist ning arengujärgust (Hu ja Tee, 2017).

Enhanserid võimendavad transkriptsiooni toimumist, tuues transkriptsiooni masinavärgi promootori juurde või vahendades spetsiifiliste distaalsete reguleerijate DNA järjestuste kontakti *core* promootoriga (Akbari *et al.*, 2008). Mehhanismid, mille kaudu enhanserid promootoreid mõjutavad, ei ole veel lõplikult selged. Välja on pakutud kaks mudelit: „*tracking*“ mudel, mille kohaselt RNAPII ja sellega assotsieerunud transkriptsionaalsed üksused „jahivad“ DNA-d promootorite ja enhanserite vahel; ja „*looping*“ mudel, mille alusel masinavärg laetakse enhanseritele ning millele järgnevalt moodustub ling promootorile ja tekivad vajalikud interaktsioonid (joonis 1). Mõlema mudeli puhul eeldatakse, et enhanserid aitavad tõsta transkriptsiooni masinavärgi aktiivsust märklauageeni promootoris (Blackwood ja Kadonaga, 1998).



Joonis 1. Promootori regulatsioon enhanseri poolt - võimalikud mudelid (Wenbo *et al.*, 2016).

1.3.1. Enhanser RNA-d

Paljudelt enhanser-elementidelt transkribeeritakse RNA molekule, mida nimetatakse enhanser RNA-deks (eRNA-d). eRNA-d ei ole pelgalt enhanser-elementi kõrvalprodukt, vaid paljud eRNA-d omavad mõju enhanseri funktsioonile (Chen *et al.*, 2017). eRNA funktsioonid on tõenäoliselt enhanser-sõltuvad: eRNA-d ei saa peale transkribeerimist liikuda teistesse kromatiini regioonidesse, kuna paljude eRNA-de arvukus ning stabiilsus on liikumiseks liialt madal (Alvarez-Dominguez *et al.*, 2014).

eRNA-d mängivad olulist rolli enhanseri aktiivsuse säilitamisel ning transkriptsiooni aktivatsioonis. eRNA-d võivad interakteeruda mediaatoriga ja kohesiini kompleksidega ning seeläbi aidata kaasa kromatiini lünga tekkimisel, mis on enhanseri ja promootori interaktsiooni tekke aluseks (Li *et al.*, 2013). Funktsionaalsed eRNA-d on potentsiaalselt seotud kõikide geeniaktivatsiooni tasanditega, alates promootori ligipääsetavusest kromatiinis, RNAPII seondumisest, silmuse moodustumisest ning transkriptsioonifaktorite seondumisest (Chu *et al.*, 2015).

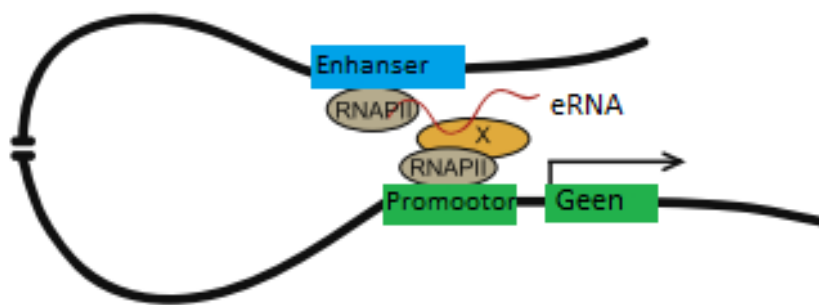
Enhanseritelt võib transkriptsioon toimuda bidirektsionaalselt, kuid ka unidirektsionaalselt. Enhanseri transkriptsiooni suuna määrab tõenäoliselt transkriptsioonifaktorite

seondusmissaitide number ning olemus (Hah *et al.*, 2013). eRNA-de ekspressiooni tase korreleerub nendele vastavate enhanserite *cis*-regulatoorse aktiivsusega ehk enhanseri poolt stimuleeritud geeni mRNA sünteesi aktiivsusega (De Santa *et al.*, 2010).

Mitmed uurimistööd on näidanud erinevaid eRNA funktsionaalseid mehhanisme. eRNA reguleerib kromatiini avatust märklaud-promootoril, mis tagab RNAPII seondumise promootorile (Mousavi *et al.*, 2013). eRNA võib olla seotud ka enhanser-promootor silmuse stabiilsuse säilitamisel, mis saavutatakse kindlate eRNA-de interaktsioonil kohesiini või mediaatorkompleksiga (Kagey *et al.*, 2010). Teatud eRNA-d seonduvad muuhulgas ka NELF-iga (negatiivne elongatsioonifaktor; *negative elongation factor*), indutseerides sellega NELF-i efektiivset vabanemist märklaudgeenilt, mis võimaldab RNAPII edaspidise elongatsiooni läbiviimist (Schaukowitch *et al.*, 2014).

eRNA-de erinevad funktsionaalsed rollid võimaldavad neid grupeerida kolme klassi. Klass I eRNA-de transkriptsioon ega transkriptid ei oma märkimisväärset funktsiooni, kuigi antud enhanserid, mis selliseid eRNA-si toodavad, on vajalikud märklaud-geeni ekspressiooniks. Klass II-te kuuluvad eRNA-d, mille transkriptsioon panustab nende funktsiooni realiseerimisse. III klassi kuuluvad eRNA-d, mis võivad seonduda valkudega ning kontrollida seeläbi geeniekspressiooni või teisi nukleaarseid protsesse (Li *et al.*, 2016).

Vähenenud eRNA-de tasemed toovad endaga kaasa vigu transkriptsiooniks vajaliku silmuse moodustumise etapis (Li *et al.*, 2013). Siiski on näited ka sellest, et eRNA ei pruugi olla kriitilise tähtsusega enhanser-promootor silmuse tekkeks – RNAPII elongatsiooni inhibeerimisel flavopitidooliga väheneb eRNA ning geeniekspressiooni tase rinnavähi rakkudes, kuid seejuures ei muutu silmuste tekkimine lokaalsel tasandil (Hah *et al.*, 2013). Siiski võib enhanseri transkriptsiooni ja silmuse moodustumise vahel olla seos – enhanseri aktivatsioon ja eRNA transkriptsioon võivad põhjustada teatud lookustes silmuse moodustumist (joonis 2), kuid teiste lookuste puhul võib silmuse moodustumine olla neist sõltumatu (Arner *et al.*, 2015).

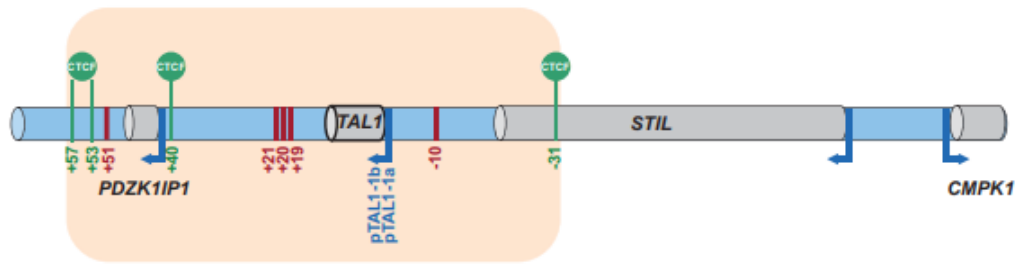


Joonis 2. Skemaatiline mudel eRNA funktsioneerimisest. Transkribeeritud eRNA-d interakteeruvad RNAPII-ga ning valkudega (X), mis võimaldab promootor-enhanser lünga moodustumist, mille tulemusena võimendatakse märklaua-geeni transkriptsiooni (Li *et al.*, 2013).

1.3.1.1. Tal1

Tal1/Scl (edaspidi Tal1) on heeliks-ling-heeliks perekonda kuuluv transkriptsioonifaktor, mis on oluline hematopoeetiliste rakkude arengus ja funktsioneerimises. Tal1 asub inimese 1. kromosoomi lühikeses õlas (1p32) ning koosneb kaheksast eksonist, mis on jaotatud 16 kb suuruse STIL ja PDZK1IP1 lookuste vahele (Aplan *et al.*, 2014) (joonis 3). Hiire (*mus musculus*) genoomis asub geen Tal1 4. kromosoomis (UCSC).

Tal1 geeni ajaline ja ruumiline ekspressioon on reguleeritud erinevate promootorite ja distaalsete enhanser-elementide poolt. Promootorid Ia ja Ib on rakutüübi spetsiifilised – Ia on aktiivne erütroidides, megakarüotsüütides ning nuumrakkudes; primitiivsetes müeloid- ning nuumrakkudes on aktiivne promootor Ib (Bockamp *et al.*, 1995). T-rakulise leukeemia puhul toodetakse transkripte aga neljandas eksonis asuvalt IV promootorilt (Bernard *et al.*, 1992).



Joonis 3. Inimese Tal1 lookuse organisatsioon (Correia *et al.*, 2016).

Tal1 kasutab ära olemasolevat epigeneetilist maastikku – vererakkude tekkel seondub Tal1 enhanseritele ning säilitatakse aktiivsed epigeneetilised modifikatsioonid, kuid kardiaalsed enhanserid muutuvad inaktiivseteks tänu aktiivsete epigeneetiliste märgiste eemaldamisele (Org *et al.*, 2015). Vererakkude arengu suunamisel mesodermis seondub Tal1 nii hematopoeetilistele kui kardiaalsetele enhanseritele, mille tulemusena reguleeritakse hematopoeetilise ja kardiaalsete rakutüüpide tekkimist. Tal1-e üle-ekspressioon diferentseeruvates embrüonaalsetes tüvirakkudes toob endaga kaasa hematopoeetiliste rakkude hulga suurenemise - Tal1 puudulikel hiirtel esinevad ektoopilised kardiomüotsüüdid rebukoti vaskulatuuris, mis viitab Tal1-e tähtsusele kardiomüotsüütide arengu repressioonis (Van Handel *et al.*, 2012).

Lisaks osaleb Tal1 ka vaskulaarses remodelleerimises ja kontrollib postnataalset angiogeneesi. Transkriptsioonifaktor reguleerib muuhulgas täiskasvanud inimese endoteeli eellasrakkude arengut aktiveerides geene, mis on seotud rakkude adhesiooni ja migratsiooniga. Nimetatud omadus on vajalik vaskulaarsetes parandusmehhanismides endoteeli rakkudes (siirdamise faasis), mida on potentsiaalselt võimalik kasutada terapeutilistes rakendustes (Palii *et al.*, 2014).

Transkriptsiooni regulaatorina mõjutab Tal1 ka onkogeenseid protsesse. Normaalsetes tingimustes surutakse T-rakkude diferentseerumise käigus Tal1-e ekspressioon alla. Tal1-e ekspressioon võib aktiveeruda T-rakkudes näiteks kromosomaalse translokatsiooni tõttu, kuid siiski on T-rakulise leukeemia indutseerimiseks vaja täiendavaid onkogeenseid sündmusi (Correia *et al.*, 2016).

Tal1-e molekulaarsete mehhanismide ning onkogeensete protsesside parem mõistmine võib avada uusi võimalusi kõrge efektiivsusega sihtmärk-teraapiate arendamiseks. Siiski on paljud

Tal1-e molekulaarsed mehhanismid veel teadmata, näiteks Tal1-e seos multiproteiinsete kompleksidega ning kromatiini remodelleerijatega (Porcher *et al.*, 2017). Meie labori avaldamata tulemused näitavad, et hiire vererakkude arengus on Tal1 vajalik PolII kohaletoomiseks enhanseritele, millega see hiljem seondub, viidates võimalusele, et Tal1 mängib rolli eRNA-de regulatsioonis.

1.4. Geeni funktsiooni uurimise meetodid

Geenide molekulaarsete mehhanismide uurimiseks kasutatakse mitmeid meetodeid, mis põhinevad geeni vaigistamisel või üleekspresseerimisel. Genoomi editeerimise meetodid võimaldavad kergemat ja efektiivsemat funktsionaalset genoomikat, transgeensete organismide loomist ja paremaid geeniteraapia võimalusi (Xhang, Wen ja Guo, 2014). Geenide vaigistamiseks on kasutatud homoloogilist rekombinatsiooni, antisense oligonukleotiide ning lühikesi interferentsi RNA-d (siRNA-d), mis on tihti madala efektiivsusega ning võivad mõjutada geene, mis ei ole märklauad (Wang *et al.*, 2014).

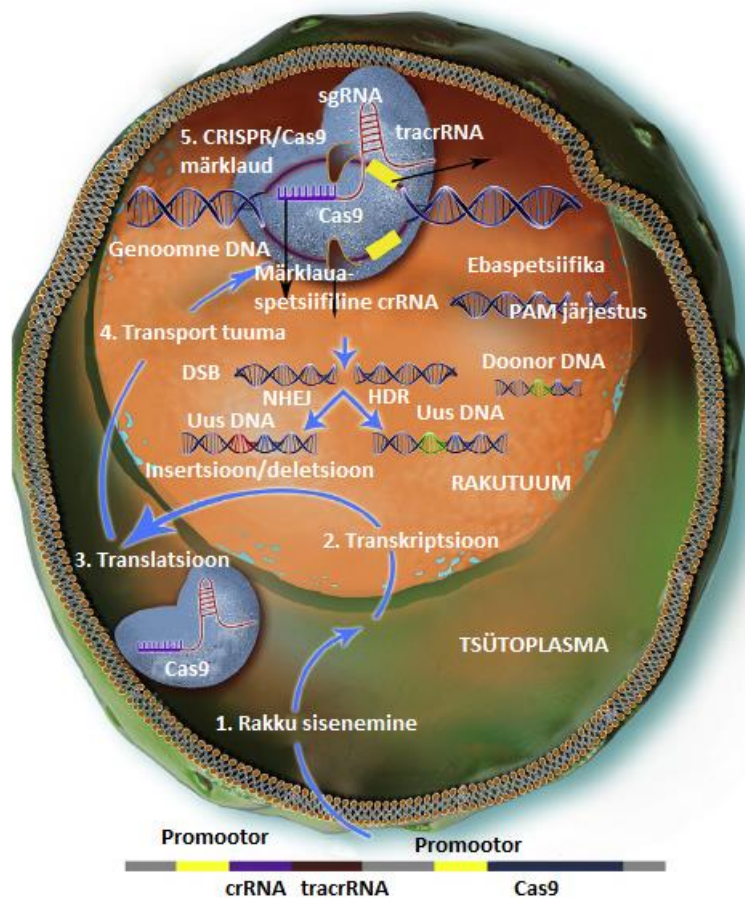
Biotehnoloogiliste meetodite areng võimaldab geenide ja genoomide editeerimist täpsemalt ning efektiivselt. Uue põlvkonna tehnoloogiad ZFN (tsink sõrme nukleas), TALEN (transkriptsiooni aktivaatori sarnane efektor-nukleas) ja CRISPR (klasterdatud regulaarsete vahedega lühikesed palindroomsed kordused) loovad uusi võimalusi ja väljavaateid nii molekulaarsete mehhanismide mõistmiseks kui ka haiguste ravimiseks (Gupta ja Musunuru, 2014).

1.4.1. CRISPR/Cas9

Klasterdatud regulaarsete vahedega lühikesed palindroomsed kordused (CRISPR) ja sellega assotsieerunud valk Cas9 võimaldavad efektiivselt läbi viia genoomi modifitseerimist. (Yuanwu *et al.*, 2014). CRISPR/Cas süsteem avastati bakterites ja arhedes immuunsüsteemi

kaitsemehhanismina viiruste ning faagide vastu läbi CRISPR-RNA-I (crRNA-I) põhineval äratundmisel ning Cas nukleaasi poolt vahendatud DNA lõikamisele (Jinek *et al.*, 2012).

Genoomi editeerimiseks kasutatav CRISPR/Cas9 tüüp II süsteem sisaldab endas Cas9 nukleaasi ning sgRNA-d (*single guide RNA*), milles on omavahel ühendatud CRISPR-RNA (crRNA) ja trans-aktiveeriv crRNA (tracrRNA). sgRNA-le seondub Cas9 nukleaas, mis järgnevalt suunatakse komplementaarsusprintsibi alusel märklaud-järjestuseni, mille läheduses peab asuma protospeisseriga külgneva motiivi (PAM) järjestus. Äratundmissaidis genereeritakse Cas9 nukleaasi poolt DNA kaheahelaline katke, mis parandatakse mitte-homoloogilise otste ühendamise (NHEJ) mehhanismi abil. NHEJ põhjustab DNA-s lühikesi insertioone või deletsioone, mis toob endaga kaasa geeni funktsiooni kadumise, mille tulemusena saadakse *knockout*. Eksogeense doonor-DNA olemasolul kasutatakse DNA parandamismehhanismina homoloogial põhinevat rekombinatsiooni (HDR), mille abil on võimalik saavutada täpseid modifikatsioone märklaud-saidis, tulemusena saadakse *knockin* (joonis 4) (Sánchez-Rivera ja Jacks, 2015).



Joonis 4. CRISPR/Cas9-vahendatud genoomi editeerimine. Vektor, mis sisaldab crRNA-d ja tracrRNA-d (moodustavad sgRNA), viiakse rakku. Peale tsütoplasmasse sisenemist, liigub vektor rakutuumas. Tuumas transkribeeritakse vektorilt Cas9 geen ning transporditakse tsütoplasmasse, et transleerida Cas9 nukleas. Järgnevalt interakteerub transkribeeritud sgRNA Cas9 nukleasiga ja moodustub kompleks, mis transporditakse tagasi rakutuumas, kus tehakse genoomsesse DNA-sse kaheahelaline katke vastavalt sgRNA komplementaarsusele. Katkega DNA-d parandatakse NHEJ või HDR mehhanismi abil (Chira *et al.*, 2017).

1.4.2. Tetratsükliin-kontrollitud transkriptsiooni regulatsioon

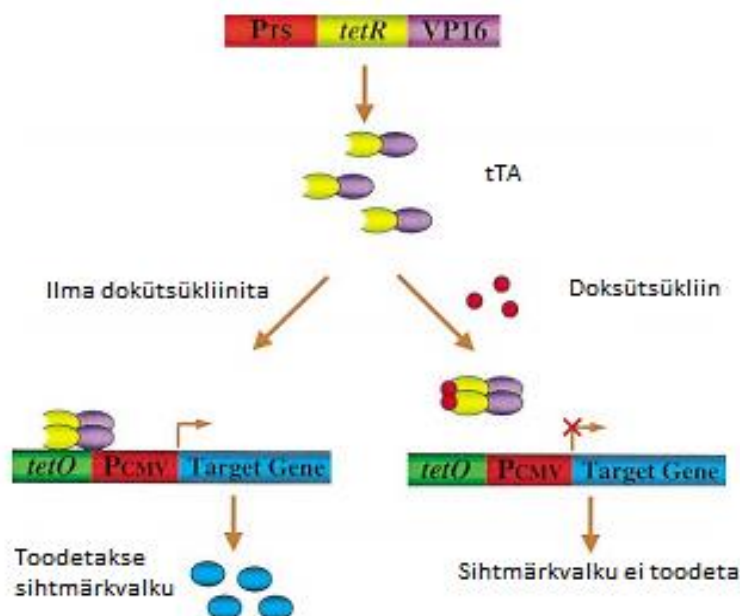
Inimgenoomi sekveneerimise projekt on üks suurimaid saavutusi teadusmaailmas. Siiski ei ole paljude valke kodeerivate geenide funktsioonid teada, samuti on komplitseeritud füsioloogiliselt ja patoloogiliselt oluliste geenide funktsiooni ja regulatsiooni uurimine. Üheks

võimalusteks geenide funktsiooni uurimisel on huvipakkuvate geenide transgeenne üleekspressioon, et teha kindlaks nende funktsioon nii *in vitro* kui ka *in vivo* mudelites (Zhu *et al.*, 2002).

Püsiva üle-ekspressiooni süsteemi poolt tekkivate piirangute tõttu on välja töötatud mitmeid konditsionaalseid või indutseeritavaid transgeenseid mudeleid. Mudelite põhifunktsioonid on sarnased ning sisaldavad kõik reguleerivat ühikut, vastutavat elementi (on seotud märklau-geeni) ja induktiooni elementi. Süsteemi kasutamine võimaldab transgeeni ekspressiooni initsieerimist või termineerimist välise indutseerija toimet (Zhu *et al.*, 2002).

Tetratsükliin-kontrollitud transkriptsiooni reguleerimise süsteem jaguneb kaheks: tTA süsteem ehk „Tet-OFF“ süsteem ning rtTA ehk „Tet-ON“ süsteem (Gossen ja Bujard, 1992). Süsteemid vajavad efektiivseks funktsioneerimiseks kahte individuaalset osa: reguleerivat osa tTA (ehk tetratsükliin-kontrollitud transaktivaator) ning kontsrukt, mis sisaldab märklau-geeni ja on minimaalse promootor-järjestuse kontrolli all koos *tet* operaatoriga (Furth *et al.*, 1994).

Tetratsükliini derivaadi dokütsükliini puudumisel seondub tTA operaatorile ning aktiveeritakse promootor, mille tulemusena initsieeritakse allavoolu asuva märklau-geeni transkriptsioon. Dokütsükliini olemasolul lülitatakse süsteem välja (joonis 5) (Furth *et al.*, 1994).



Joonis 5. Tetratsükliin-kontrollitud transkriptsiooni aktiveerimise (tTA) süsteem: „Tet-Off“. Koe- või rakutüübi spetsiifiline promootor (Pts) kontrollib tTA, tetratsükliini repressori liitvalgu

TetR ja transkriptsiooni aktiveerimise domeeni VP16 ekspressiooni. Reguleerimisagendi dokütsükliini (Dox) puudumisel seondub tTA tetratsükliin-resistentsuse operonile *tetO*-le ning aktiveerib miinimum promootori *Pcmv*, mis viib allavoolus asuva märklaugeeni ekspressioonini. Dox-i olemasolul dissotsieerub tTa *tetO*-lt ning elimineerib märklaugeeni transkriptsiooni ei toimu (Zhu et al., 2002).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli konstrueerida vajalikud töövahendid transkriptsioonifaktori Tal1-e funktsiooni molekulaarsete toimemehhanismide uurimiseks. Antud töös valminud konstrukte on plaanis kasutada hematopoeetilise rakuliini valmistamiseks, milles Tal1 ekspressiooni oleks võimalik kontrollida doksütsükliini abil. Esmalt lisatakse rakuliini „Tet-OFF“ süsteem, mis võimaldaks Tal1 geeniekspressiooni lihtsalt sisse ja välja lülitada. Seejärel kasutatakse endogeense Tal1 inaktiivseks muutmiseks CRISPR/Cas9-i põhinevat meetodit.

Eelpool mainitud eesmärkide saavutamiseks :

1. Disainiti, kloneeriti ja paljundati kaks Tal1-e crDNA-d pX-458 Not1 plasmidi;
2. Võttes aluseks FudeluGW-M2rtta-P2A-mCherry plasmidi asendati plasmidis sisalduv rtTA tTA-ga, et luua „Tet-ON“ süsteemi asemel „Tet-OFF“ süsteem;

2.2. Materjalid ja metoodika

2.2.1. CRISPR DNA konstrueerimine ja kloneerimine

CRISPR plasmidi konstrueerimiseks disainiti esmalt Tal1 geenile vastavad oligonukleotiidid, milleks kasutati CHOPCHOP programmi. Vajalike oligonukleotiidide saamiseks kasutati Tal1 geeni järjestust hiire (*mus musculus*; mm9) genoomis positsioonis chr4:114,735,636-114,735,875:

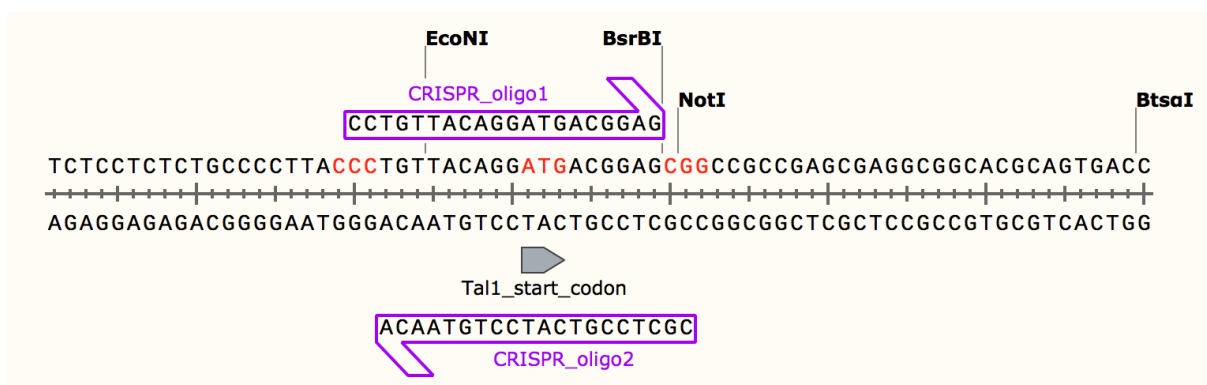
```
5'AGCAGGGTTGGGGTGTGCGTCCACGTGGTGCTGAGTTTGTCTGTCCGCTTTTCAGGTTTCAGTGC  
GTGATCTCCTCTCTGCCCCTTACCCTGTTACAGGATGACGGAGCGGCCGCCGAGCGAGGCGGCACGC
```

AGTGACCCGCAACTAGAGGGACAGGACGCGGCCGAGGCCCGCATGGCCCCCGCACCTAGTCCTG
CTCAACGGCGTCGCCAAGGAGACGAGCCGCGCAGCCCCGGC 3'.

Programmi abil saadud *forward* oligonukleotiidid (tabel 1) seonduvad Tal1-e geenile vastavalt joonisel 6 toodule.

Tabel 1. CRISPR-Tal1 oligod. Tumedalt on tähistatud kloneerimiseks vajalikud üleulatuvad otsad.

Oligonukleotiidi number	Ahel	Järjestus
1	Forward	5' CACCC CTGTTACAGGATGACGGAG 3'
	Reverse	5' AAAC CTCCGTCATCCTGTAACAGG 3'
2	Forward	5' CACCC GCTCCGTCATCCTGTAACA 3'
	Reverse	5' AAAC TGTTACAGGATGACGGAGCG 3'



Joonis 6. Tal1 geenile disainitud oligonukleotiidide seondumine. Punasega on märgitud Tal1 Start koodon ATG ja CRISPR oligonukleotiidide jaoks vajalik PAM järjestus (NGG – N nukleotiid ning kaks suvalist nukleotiidi).

Vajaliku plasmidi loomise eesmärgil kasutati konstukti selgroona pX-458 Not1 plasmidi (lisa 1). 1 µg pX-458 Not1 plasmidi lõigati BbsI restriктаasiga (Thermo Scientific) 40 µl-s lõppmahus tootja protokollil alusel. Restriksiooni reaktsiooni läbiviimiseks inkubeeriti proovi 60 minutit 37°C juures.

Järgnevalt viidi läbi restrikteeritud plasmidi puhastamine geelelektroforeesi abil. Selleks valmisati 1%-line agarosi geel 0,5 TBE (tris/borate/eDTA) puhvriga, millele lisati

etiidiumbromiidi (100 ml kohta 5 µl kontsentratsiooniga 5 mg/ml; edaspidi sama põhimõtte alusel). Õige pikkusega DNA fragment lõigati skalpelliga geelist välja ja DNA puhastamiseks kasutati Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up komplekti vastavalt tootja protokollile.

Enne ligeerimist teostati CRISPR-järjestuste *annealing*, mille jaoks segati omavahel kokku 4+4 µl 100 µM *forward* ja *reverse* oligonukleotiidi (tabel 1), mida seejärel inkubeeriti PCR-i masinas (MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler) kasutades järgnevat programmi:

1. 30 minutit 37°C juures;
2. 5 minutit 95°C juures;
3. 95°C jahutamine 25°C-ni kiirusega 0,1°C sekundis;

Ligeerimiseks valmistati segu, mis sisaldas 5 µl BbsI-ga lõigatud pX-458 Not1 plasmidi, 1 µl *anneal*-itud oligonukleotiidi, 1 µl 10x T4 ligaasi puhvrit, 0,2 µl T4 ligaasi (Thermo Scientific) ning 2,8 µl mQ-d. Ligatsioonisegu hoiti 10 minutit 22°C juures, millest järgnevalt 5 µl lisati 50 µl-le kompetentsetele bakterirakkudele (Invitrogen™ One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. Coli*). Rakke inkubeeriti 15 minutit jääl. Viidi läbi kuumašokk, inkubeerides bakterirakke 45 sekundit 42°C juures ja 2 minutit jääl. Bakterirakkudele lisati 1 ml LB (lüsogeenne sööde) vedelsöödet ja inkubeeriti 45 minutit 37°C juures loksutil (180 pööret/minutis). Järgnevalt fuugiti rakud 10 minutit 3 000x g juures, eemaldati supernatant, rakud suspendeeriti 50 µl LB söötmes ning külvati LB tardsöötmele ampitsilliini (kontsentratsiooniga 100 µg/ml) sisaldavale tassile ja inkubeeriti 37°C juures üleöö.

Saadud üksikutest kolooniatest pandi mõlema oligonukleotiidiga loodud plasmidi sisaldavad bakterid kasvama 2 ml LB vedelsöötmesse, millele lisati 2 µl apitsilliini kontsentratsiooniga 100 mg/ml ja inkubeeriti üleöö 37°C juures loksutil (180 pööret/min).

Viidi läbi plasmiidide eraldamine bakterirakkudest Macherey – Nagel NucleoBond Xtra Midi komplekti järgi *miniprep*-i põhimõttel. Selle tarbeks viidi kasvatatud bakterirakud 1,5 ml tuubi ning fuugiti 10 minutit 3000x g juures. Eemaldati supernatant ning resuspendeeriti rakud 300 µl-is *Resuspension Buffer*-is ja lisati 300 µl *Lysis solution*-it. Tuube kallutati järgnevalt 5 korda, mille järel lisati 300 µl *Neutralizing Solution*-it ja kallutati tuube, kuni sinine värv kadus. Seejärel fuugiti tuube 10 minutit 13 000x g juures. Eemaldati 750 µl supernatanti, mis viidi uute 1,5 ml tuubi ning millele lisati 750 µl isopropanooli. Tuube fuugiti 10 minutit 13 000x g juures, peale mida eemaldati supernatant ning lisati eraldatud DNA-le 500 µl 70% etanooli.

Tuube fuugiti 13 000x g juures 10 minutit, järgnevalt eemaldati supernatant ning kuivatati tuube 37°C juures avatud korgiga etanooli täieliku aurustumiseni. DNA lahustati seejärel 30 µl-is mQ-s.

Eraldatud plasmide kontrolliti NotI restriktasiga (*Thermo Scientific*) lõikamise abil, kasutades restriksiooniks tootja poolt etteantud protokollit.

Plasmide paljundati 200 ml LB vedelsöötmes (koos 200 µl apitsilliini kontsentratsiooniga 100 mg/ml). DNA eraldati bakterirakkudest Macherey – Nagel NucleoBond Xtra Midi komplekti järgi tootja etteantud protokollit alusel.

2.2.2. „Tet-OFF“ plasmidi konstrueerimine ja klonereerimine

Plasmidi konstrueerimise eesmärgil amplifitseeriti PCR-i abilt esmalt pTet-OFF plasmidi (lisa 2) tTa lõik ehk tetratsükliin-kontrollitud transaktivaator. Amplifitseerimiseks kasutati järgmiseid praimereid (restriksiooniensüümide lõikamissaidid on märgitud punasega):

1. 5' TAGACA**GGATCC**ACCATGTCTAGACTGGACAA 3'
2. 5' CTATAG**GAATTC**TTACTTAGTTACCCGGGGAG 3'

DNA amplifitseerimine viidi läbi NEBNext® High-Fidelity 2X PCR Master Mix-i abil (lõppmaht 20 µl) tootja poolt etteantud protokollit alusel. Kasutati tabelis 2 esitatud PCR-i programmi.

Tabel 2. PCR-i programm pTet-OFF transaktivaatori amplifikatsiooniks.

Protsess	Temperatuur	Aeg (s)	Tsükli arv
Esmane denaturatsioon	98°C	30	
Denaturatsioon	98°C	10	5
Praimerite seondumine	63°C	30	
Elongatsioon	72°C	60	
Denaturatsioon	98°C	10	27
Praimerite seondumine	69°C	30	
Elongatsioon	72°C	60	
Lõplik elongatsioon	72°C	120	
Hoidmine	4°C	lõpmatus	

Amplifikatsioonile järgnevalt restrikteeriti PCR-i produkti ensüümidega BamHI ja EcoRI EcoRI puhvris (*Thermo Scientific*) tootja poolt ettenähtud protokollil alusel. Peale restriksiooni puhastati lõigatud PCR-i produkt agarosgeelist kasutades Macherey-Nagel NucleoSpin „Gel and PCR Clean-up“ komplekti vastavalt tootja poolt etteantud protokollile.

BamHI ja EcoRI restriksiooniensüümidega viidi läbi lõikamine ka FudeluGW-M2rtta-P2A-mCherry (edaspidi mCherry) (lisa 3) plasmiidil, et eemaldada rtTA (*reverse tetracycline-controlled transactivator*) ja mCherryt sisaldav DNA fragment. Lõigatud mCherry plasmiid puhastati geelelektroforeesi abil. Selleks valmistati 2%-line agarosgeel (etiiduimbromiidiga). Agarosgeelist puhastati välja restriksiooni käigus saadud ülemine fragment Macherey-Nagel NucleoSpin „Gel and PCR Clean-up“ komplekti abil tootja protokollil alusel.

„Tet-OFF“ plasmidi kontrueerimise eesmärgil ligeeriti järgnevalt restrikteeritud plasmiid ja PCR-i produkt (mCherry ja pTet-OFF) T4 ligaasi (*Thermo Scientific*) abil (lõppmaht 20 µl) tootja poolt ettenähtud protokollil alusel.

5 µl ligeeritud plasmidi viidi seejärel 50 µl-sse kompetentsetesse bakterirakkudesse (sarnaselt punktidele 2.1.1.) kuumašokiga ning kasvatati LB vedelsöötmes ampicilliini (kontsentratsioon 100 µg/ml) juuresolekul 37° C juures üleöö (sarnaselt peatükis 2.2.1. kirjeldatule).

Saadud kolooniatest valiti 4, mida paljundati 6 ml LB vedelsöötmes (6 µl ampicilliini kontsentratsiooniga 100 µg/ml juuresolekul) üleöö loksutil (180 pöör/min). Järgnevalt eraldati bakterirakkudest DNA Macherey – Nagel NucleoBond Xtra Midi komplekti järgi *miniprep*-i protokoll järgi (toodud peatükis 2.2.1.).

Saadud konstrukte kontrolliti esmalt PCR-i abil. Selle tarbeks kasutati pTet-OFF amplifitseerimiseks kasutatud praimereid ning NEBNext® High-Fidelity 2X PCR Master Mix-i tootja poolt etteantud protokoll alusel.

Saadud tulemuste põhjal valiti välja plasmid number 3 ning paljundati 200 ml LB vedelsöötmes (sarnaselt peatükis 2.2.1. toodule). Teostati plasmidi täiendav kontroll restriktasid BamHI ja EcoRI abil (sarnaselt mCherry plasmidi lõikamisele).

2.3. Tulemused ja arutelu

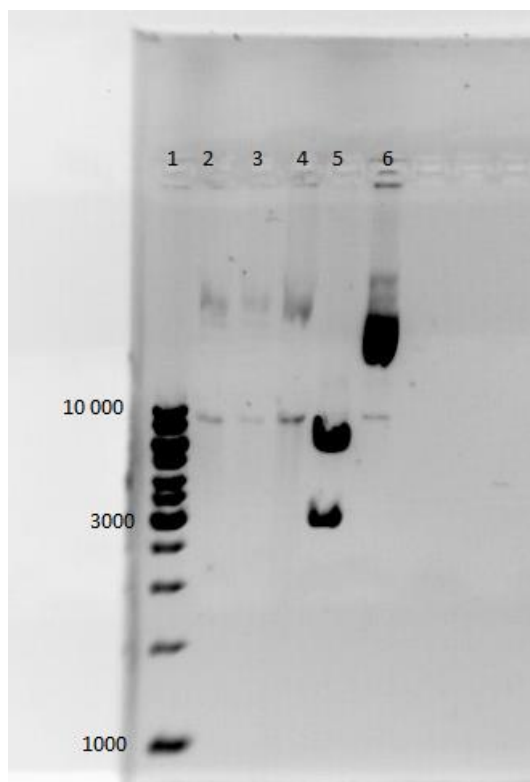
Tal1 on kriitilise tähtsusega transkriptsioonifaktor vereloome tüvirakkude arengus, täiskasvanute hematopoeetiliste tüvirakkude säilitamisel ja vaigistamisel, samuti vererakkude terminaauses küpsemises (Porcher *et al.*, 2017). Tal1 mõjutab ka onkogeenseid protsesse ja häired tema funktsioonis võivad põhjustada leukeemia tekke (Correia *et al.*, 2016).

Käesoleva bakalaureusetöö raames konstrueeriti kaks plasmidi - CRISPR Tal1 (kahe erineva sgRNA inserdiga) ja „Tet-OFF“, mida kasutatakse transkriptsioonifaktori Tal1-e edaspidiseks uurimiseks.

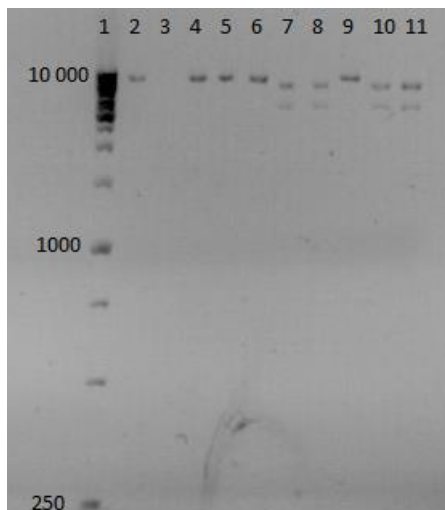
2.3.1. CRISPR-Tal1

Konstrueeritud CRISPR-Tal1 plasmide kontrolliti restriksioonanalüüsi abil. Restrikteeritud plasmide analüüsi teegelektroforeesi abil (0.25 µg/ml etiidiumbromiidi sisaldav 1,5% TBE agarosgeel). Saadud tulemused on esitatud joonisel 7 ja 8.

Kasutatud pX-458 NotI plasmidi on lisaks seal juba olnud NotI äratundmisjärjestusele lisatud ka teine NotI äratundmise järjestus crDNA lisamise kohta, mis võimaldab antud ensüümiga restrikteerides määrata, kas insert on vektorisse korrektselt läinud või mitte. Peale plasmidi BbsI restriksiooniensüümiga lõikamist eemaldatakse üks NotI äratundmise järjestus ja korrektse inserdi olemasolul CRISPR-Tal1 plasmid lineariseerub ning moodustub 9 kb suurune fragment. Kui insert ei ole korrektselt inserteerunud, lõigatakse plasmidi kahest kohast ja tekivad umbes 3 kb ja 6 kb pikkused fragmendid.



Joonis 7. Konstrueeritud CRISPR-Tal1 plasmidide (1. oligonukleotiidiga) lõikamine NotI restriksiooniensüümiga. Rada 1 - Fermentas O'GeneRuler 1 kb DNA ladder; rada 2 – restrikteeritud CRISPR-Tal1 proov number 1-1; rada 3 – restrikteeritud CRISPR-Tal1 proov number 1-2; rada 4 – restrikteeritud CRISPR-Tal1 proov number 1-3; rada 5 – restrikteeritud pX-458 NotI plasmid; rada 6 – restrikteerimata pX-458 NotI plasmid.

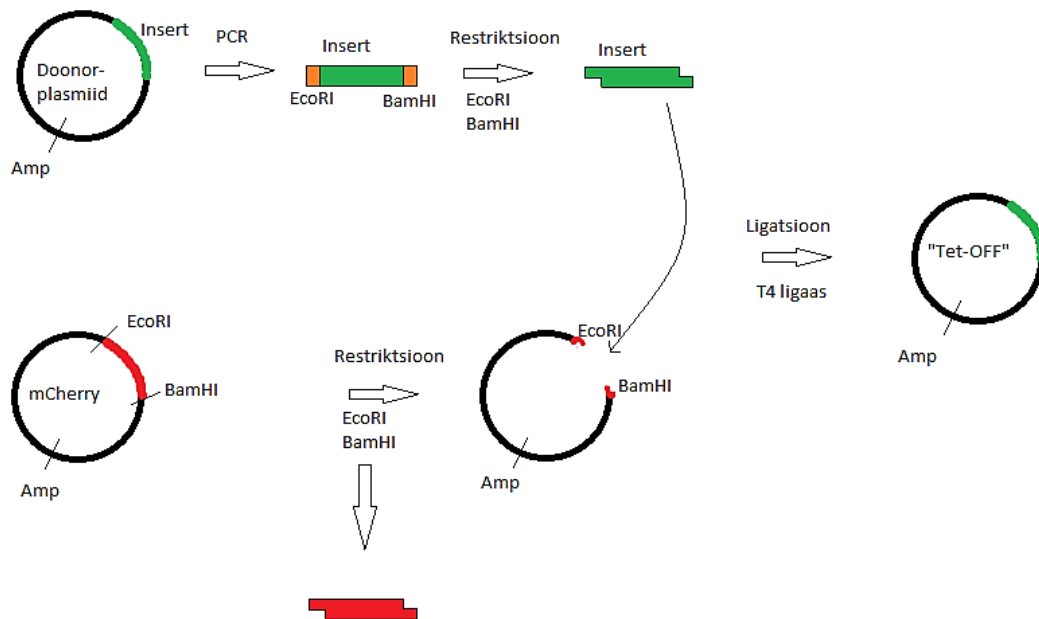


Joonis 8. Konstrueeritud CRISPR-Tal1 plasmiidide (2. oligonukleotiidiga) lõikamine NotI restriktsooniensüümiga. Rada 1 - Fermentas O'GeneRuler 1 kb DNA ladder; radadel 2-11 – restrikteeritud kolooniad 1-10.

Edaspidiseks plasmiidide paljundamiseks valiti restriktsoonianalüüsi abil CRISPR-Tal1 1. oligonukleotiidi kasutades proovil number 1-3 (joonis 7) ning CRISPR-Tal1 2. oligonukleotiidi kasutades proovil number 2-5 (joonis 8), kuna läbi viidud insertiooni tulemusena kadus selgroona kasutatud pX-458 NotI plasmiidist üks NotI lõikamissait ning konstrueeritud plasmiid lineariseerus. Inserti mittekorrektsele sisenemisele säilis kaks NotI-e lõikamissaiti ning vastava ensüümiga lõikamisel tekivad umbes 6 kb ja 3 kb suurused fragmendid.

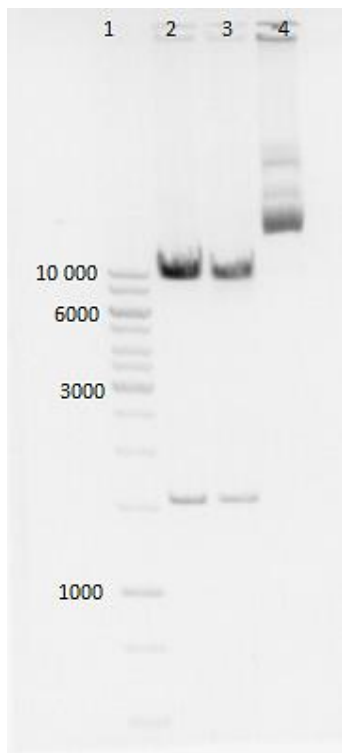
2.3.2. „Tet-OFF“

„Tet-OFF“ plasmidi konstrueerimise tarbeks viidi läbi klonimine (joonis 9), mille käigus paljundati doonorplasmidis olevat transaktivaator (tTA) lõiku. BamHI ja EcoRI ensüümidega restrikteeriti nii PCR-i käigus saadud produkt kui ka retsipientplasmiid (mCherry). Seejärel viidi läbi ligatsioon ning viidi saadud konstrukti paljundamiseks bakterirakkudesse. Korrektsed konstruktid valiti välja kontrollimiseks kasutatud restriktsoonianalüüsi käigus saadud tulemuste põhjal.



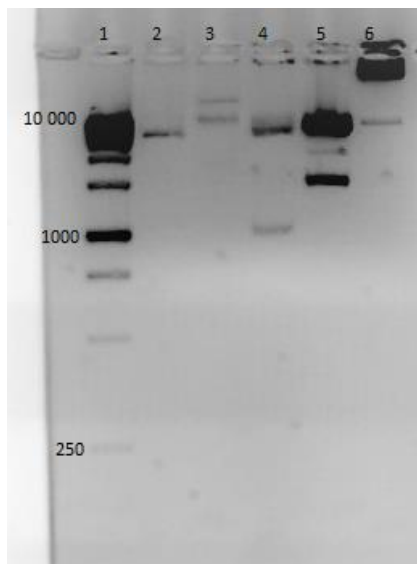
Joonis 9. „Tet-OFF“ plasmiidi kloonimine.

„Tet-OFF“ plasmiidi konstrueerimise esimese etapina viidi läbi mCherry plasmiidi restrikteerimine BamHI ja EcoRI ensüümidega. Saadi joonisel 10 toodud tulemused. Restrikteerimise tulemusena tekkis kaks fragmenti, mis olid 1 533 ja 9 191 aluspaari pikkused. Edaspidiseks tööks kasutati konstrueeritava plasmiidi selgroona DNA-d, mis puhastati 2. rajal asuvast ülemise fragmendi 9 191 suurusest DNA lõigu geelitükist.



Joonis 10. BamHI ja EcoRI restriktasidiga lõigatud mCherry plasmiidid. Rada 1 – Fermentas O'GeneRuler 1 kb DNA ladder; rada 2-3 - restrikteeritud mCherry plasmiid; rada 4 – restrikteerimata mCherry plasmiid (negatiivne kontroll).

Kloneerimisele järgnevalt kontrolliti plasmide restriksioonanalüüsiga. Plasmidi restrikteerimisel BamHI ja EcoRI ensüümidega saadi joonisel 11 toodud tulemused. Analüüsi tulemusena selgus, et valitud plasmiid number 3 sisaldas korrektse 1 008 aluspaari pikkusega fragmenti.



Joonis 11. „Tet-OFF“ plasmidi kloonimistulemuste kontroll restriktaaside BamHI ja EcoRI abil. Rada 1 ja 6 - Fermentas O'GeneRuler 1 kb DNA ladder; rada 2 - restrikteeritud plasmid number 1; rada 3 – restrikteeritud plasmid number 2; rada 4 – restrikteeritud plasmid number 3; rada 5 – restrikteeritud mCherry plasmid; rada 6 – restrikteerimata mCherry plasmid.

Lisaks konstrueeritud „Tet-OFF“ plasmidile on vaja süsteemi töötamiseks ka pNL-TRE/pit-Tal1-IRES-EGFP plasmidi (lisa 4), mis sisaldab Tal1 geeni järjestust. Nimetatud plasmid on vajalik eksogeense Tal1 geeni ekspressiooniks, kuna endogeenne Tal1 muudetakse CRISPR-Tal1 konstrukti abil mittefunktsionaalseks.

Transkriptsioonifaktori Tal1 uurimiseks loodava püsirakuliini loomise plaan on toodud joonisel lisa 4. Järgmise etapina viiakse „Tet-OFF“ süsteem sobivasse rakuliini (416B – müeloidsed eellasrakud) lentiviiruse abil, kuna elektroporatsiooni efektiivsus on antud rakuliini puhul suhteliselt madal, samuti on oluline konstruktide integratsioon genoomi. Selleks transfekteeeritakse HEK-rakke kolme vajaliku plasmidiga (lisa 5). Lentiviirus luuakse nii „Tet-OFF“ plasmidi kui ka pNL-TRE/pit-Tal1-IRES-EGFP plasmidi sisestamiseks. HEK rakkudest vabanevaid lentiviiruseid kasutatakse seejärel 416B rakuliini nakatamiseks. Mõlema viirusega nakatunud rakke on võimalik selekteerida GFP alusel. Kui „Tet-OFF“ süsteemiga rakuliin on loodud, kasutatakse CRISPR-Tal1 plasmidi rakkudesse viimiseks elektroporatsiooni. CRISPR-Tal1 konstruktiga rakkudele tehakse klonaalne selektsioon esmalt GFP alusel ning seejärel kontrollitakse üksikutest rakkudest saadud rakuliinides Tal1 lookust. Edasiseks tööks valitakse

rakuliin, milles on endogeenne Tal1 muudetud tänu CRISPR-Tal1 konstruktile mittefunktsionaalseks. Tänu rakkudesse viidud doksütsükliiniga kontrollitavale „Tet-OFF“ süsteemile, on võimalik Tal1 geeni ekspressiooni doksütsükliiniga maha suruda.

Loodav rakuliin võimaldab uurida Tal1 molekulaarseid toimetehhanisme Tal1 juuresolekul ja puudumisel, kasutades selleks erinevaid ülegenoomseid metoodikaid nagu RNA-seq, ATAC-seq, ChIP-seq, ChIA-PET ja ka teha funktsionaalseid katseid, näiteks teatud reguleerijate loomuste editeerimine CRISPR/Cas9 abil. Antud süsteemi eeliseks on Tal1-e ekspressiooni lihtne kontrollitavus kõikides rakkudes, samuti on antud rakuliini lihtne kasvatada. Seetõttu on Tal1 funktsiooni uurimiseks võimalik kasutada meetodeid, mis nõuavad suuremat hulka rakke (näiteks ChIA-PET). Kasutatava süsteemi miinuseks on eksogeense Tal1-e ekspressioonitaseme potentsiaalne erinevus võrreldes endogeense ekspressiooniga. Samuti ei ole rakuliinis saadud tulemusi alati lihtne võrrelda *in vivo* olukorraga.

KOKKUVÕTE

Embrüonaalses arengus tehtavad ajalised ning ruumilised geeniekspressiooniga seotud otsused mängivad kriitilist rolli nii embrüo arengus kui ka terapeutilistes rakendustes. Transkriptsioonifaktor Tal1 on üks peamistest regulaatoritest, mis tagab hematopoeetilise süsteemi tekkimise ning on muuhulgas oluline ka ektoopilise kardiomüotsüütide ärahoidmises hemogeensetes kudedes (Van Handel *et al.*, 2012). Lisaks omab Tal1 rolli T-rakulise leukeemia arengus.

Paremad arusaamad peamiste regulaatorite poolt esile kutsutud geenide aktivatsioonist ja repressioonist ning epigeneetiliste piiride loomisest rakkudes on olulised efektiivsete terapeutiliste aplikatsioonide arendamiseks.

Käesoleva töö eesmärgiks oli konstrueerida Tal1 geeni edaspidiseks uurimiseks vajalikud vahendid – Tal1 geeni inaktiveerimiseks vajalik CRISPR konstruktt ning „Tet-OFF“ süsteem, mis võimaldavad antud geeni funktsiooni ja mehhanismi uurimist *in vitro* Tal1 indutseeritava ekspressiooniga hematopoeetilises püsirakuliinis.

Construction of CRISPR-Tal1 and "Tet-Off" plasmids to study transcription factor Tal1

Mare Vahtre

Summary

The ability to execute developmental fate decisions with proper temporal and spatial control is critical for embryonic development, as well as harnessing the power of stem cell and reprogramming technologies for therapeutic applications. The transcription factor Tal1 has emerged as a true master regulator that governs the establishment of the entire hematopoietic system and it is also critical for preventing ectopic cardiomyocyte development in hemogenic tissues. Moreover, Tal1 plays role in development of T-cell leukemia.

Therefore, understanding of the prerequisites for gene activation and repression by master regulators and how the epigenetic boundaries are created between cell types, will help develop more effective protocols for therapeutic applications.

The purpose of given thesis was to construct necessary tools for further research of Tal1 – CRISPR-Tal1 plasmids and „Tet-OFF“ system was constructed in order to be able to study the function and molecular mechanisms of Tal1 *in a* knock-out cell line with controllable Tal1 expression.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada bakalaureusetöö valmimise eest juhendajat Tõnis Orgi, kes abistas katsete läbiviimisel, tulemuste analüüsimisel ning aitas alati vajaliku nõu ja jõuga. Samuti tänan ka kõiki molekulaarse biotehnoloogia labori töötajaid ja tudengeid, kes vajaduse korral ulatasid lahkelt oma abikäe.

KASUTATUD KIRJANDUS

- A, Heinaru. 2012. *Geneetika. Õpik kõrgkoolile*. Tartu Ülikooli kirjastus.
- Akbari, O. S., Bae, E., Johnsen, H., Villaluz, A., Wong, D., Drewell, R. A. 2008. A novel promoter-tethering element regulates enhancer-driven gene expression at the bithorax complex in the *Drosophila* embryo. *Development*, 135: 123–131.
- Arner, E., et al., 2015. Gene regulation. Transcribed enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells. *Science*, 347: 1010-1014.
- Alvarez-Dominguez, J. R., et al. 2014. Global discovery of erythroid long noncoding RNAs reveals novel regulators of red cell maturation. *Blood*, 123: 570–581.
- Aplan, P., Begley, C., Bertness, V., Nussmeier, M., Ezquerra, A., Coligan, J., et al. (1990). The SCL gene is formed from a transcriptionally complex locus. *Mol Cell Biol*, 10: 6426–6435.
- Badis, G., et al. 2009. Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. *Science*, 324: 1720-1723.
- Barrett, L. W., Fletcher, S., Wilton, S. D. 2011. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69: 3613–3634.
- Bernard, O., Azogui, O., Lecointe, N., Mugneret, F., Berger, R., Larsen, C., et al. 1992. A third tal-1 promoter is specifically used in human T cell leukemias. *J Exp Med*, 176: 919–925.
- Blackwood, E., Kadonaga, J. 1998. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science*, 281: 60–63.
- Bockamp, E., McLaughlin, F., Murrell, A., Gottgens, B., Robb, L., Begley, C., et al. 1995. Lineage-restricted regulation of the murine SCL/TAL-1 promoter. *Blood*, 86: 1502–1514.
- Brent, M. M., et al. 2008. Structural basis for DNA recognition by FoxO1 and its regulation by post translational modification. *Structure*, 16: 1407–1416.

- Chen, H., Du, G., Song, X., Li, L. 2017. Non-coding Transcripts from Enhancers: New Insights into Enhancer Activity and Gene Expression Regulation. *Genomics and Proteomics Bioinformatics*, 15: 201-207.
- Chira, S., Gulei, D., Hajitou, A., Zimta, A. A., Cordelier, P., & Berindan-Neagoe, I. 2017. CRISPR/Cas9: Transcending the Reality of Genome Editing. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, 7: 211-222.
- Chu, C., *et al.* 2015. Systematic discovery of xist RNA binding proteins. *Cell*, 161: 404–416 .
- Consortium, T. E. 2007. Identification and analysis of functional. *Nature*, 447: 799-816.
- Correia, N., Arcangeli, M.-L., Pflumio, F., JT Barata, J. 2016. Stem Cell Leukemia: how a TALEnted actor can go awry on. *Leukemia*, 30: 1968–1978.
- Cremer, T., Cremer, C. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene. *Nat Rev Genet*, 2: 292–301.
- De Santa, F., Barozzi, I., Mietton, F., Ghisletti, S., Polletti, S., Tusi, B., *et al.* 2010. A large fraction of extragenic RNA pol II transcription sites overlap enhancers. *PLoS Biol.*
- Fisher, W. W., *et al.* 2012. DNA regions bound at low occupancy by transcription factors do not drive patterned reporter gene expression in *Drosophila*. *PNAS*, 109: 21330–21335.
- Furth, P., Onge, L. S., Boger, H., Gruss, P., Gossen, M., Kistner, A. 1994. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 9302–9306.
- Gehring, W. J., *et al.* 1994. Homeodomain–DNA recognition. *Cell*, 78: 211-223.
- Gossen, M., Bujard, H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 5547–5551.
- Grosschedl, R., Birnstiel, M. L. 1980. Spacer DNA sequences upstream of the T-A-T-A-A-A-T-A sequence are essential for promotion of H2A histone gene transcription in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 7102–7106.
- Gupta, R. M., Musunuru, K. 2011. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *The Journal of Clinical Investigation*, 124: 4154-4161.

- Hah, N., Murakami, S., Nagari, A., Danko, C., Kraus, W. 2013. Enhancer transcripts mark active estrogen receptor binding sites. *Genome Res*, 23: 1210-1223.
- Hu, Z., Tee, W.-W. 2017. Enhancers and chromatin structures: regulatory hubs in gene expression and diseases. *Biosci Rep*, 37: 1-13.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J., Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337: 816–821.
- Juven-Gershon, T., Hsu, J., Theisen, J., Kadonaga, J. 2008. The RNA polymerase II core promoter—the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol*, 20: 253–259.
- Kagey, M., Newman, J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D., *et al.* 2010. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*, 467: 430–435.
- Klug, A. 2010. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Q. Rev. Biophys*, 43: 1-21.
- Levine, M. 2010. Transcriptional enhancers in animal development and evolution. *Curr. Biol*, 20: 754-763.
- Levine, M., Tjian, R. 2003. Transcription regulation and animal diversity. *Nature*, 424: 147–151.
- Li, W., Notani, D., G. Rosenfeld, M. 2016. Enhancers as non-coding RNA. *Nature Reviews*, 17: 207-223.
- Li, W., Notani, D., Ma, Q., Tanasa, B., Nunez, E., Chen, A., *et al.* 2013. Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent. *Nature*, 498: 516–20.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J., Church, G. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339: 823–826.
- Maniatis, T., Goodbourn, S., Fischer, J. A. 1987. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science*, 236: 1237–1245.
- Mousavi, K., *et al.* 2013. eRNAs promote transcription by establishing chromatin accessibility at defined genomic loci. *Mol. Cell*, 51: 606–617.

- Org, T., Duan, D., Ferrari, R., Montel-Hagen, A., Handel, B. V., Kerényi, M. A., Mikkola, H. K. 2015. Scl binds to primed enhancers in mesoderm to regulate hematopoietic and cardiac fate divergence. *The EMBO Journal*, 34: 759-777.
- Palii, C., Vulesevic, B., *et al.* 2014. Trichostatin A enhances vascular repair by injected human endothelial progenitors through increasing the expression of TAL1-dependent genes. *Cell Stem Cell*, 14: 644-657.
- Phillips, T. 2008. Regulation of Transcription and Gene Expression in Eukaryotes. *Nature Education*, 1: 199.
- Porcher, C., Chagraoui, H., Kristiansen, M.S. 2017. SCL/TAL1: a multifaceted regulator from blood development to disease. *Blood*, 129: 2051-2060.
- Sánchez-Rivera, F. S., Jacks, T. 2015. Applications of the CRISPR–Cas9 system in cancer biology. *Nature Reviews. Cancer*, 15: 387-395.
- Schaffner, W. 2015. Enhancers, enhancers – from their discovery. *Biol. Chem.*, 396: 311-327.
- Schaukowitch, K., Joo, J., Liu, X., Watts, J. K. 2014. Enhancer RNA facilitates NELF release from immediate early genes. *Molecular cell*, 56: 29-42.
- Shivaswamy, S., *et al.* 2008. Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation. *PLoS Biol*, 6: 6-65.
- Smale, S. T., Kadonaga, J. T. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem*, 72: 449–479.
- Todeschini, A.-L., Georges, A., Veitia, R. A. 2014. Transcription factors: specific DNA binding and specific gene regulation. *Trends in Genetics*, 30: 211-219.
- Tuerk, C., Gold, L. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249: 505-510.
- Van Handel B. *et al.* 2012. Scl represses cardiomyogenesis in prospective hemogenic endothelium and endocardium. *Cell*, 150: 590 – 605.
- Veitia, R. A., *et al.* 2013. Gene dosage effects: nonlinearities, genetic interactions, and dosage compensation. *Trends Genet*, 29: 385–393.

- Visel, A., Blow, M., Li, Z., Zhang, T., Akiyama, J. A., Holt, A. 2009. ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature*, 457: 854–858.
- Wang, L., *et al.* 2014. CARM1 methylates chromatin remodeling factor BAF155 to enhance tumor progression and metastasis. *Cancer Cell*, 25: 21-36.
- Wenbo, L., Dimple, N., Rosenfeld, M. 2016. Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives. *Nature Reviews*, 17: 207-223.
- Yuanwu, M., Lianfeng, Z., Xingxu, H. 2014. Genome modification by CRISPR/Cas9. *the FEBS Journal*, 281: 5186-5193.
- Zhu, Z., Zheng, T., Lee, C. G., Homer, R. J., Elias, J. A. 2002. Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Semin Cell Dev Biol.*, 13: 121-128.

Kasutatud veebiaadressid

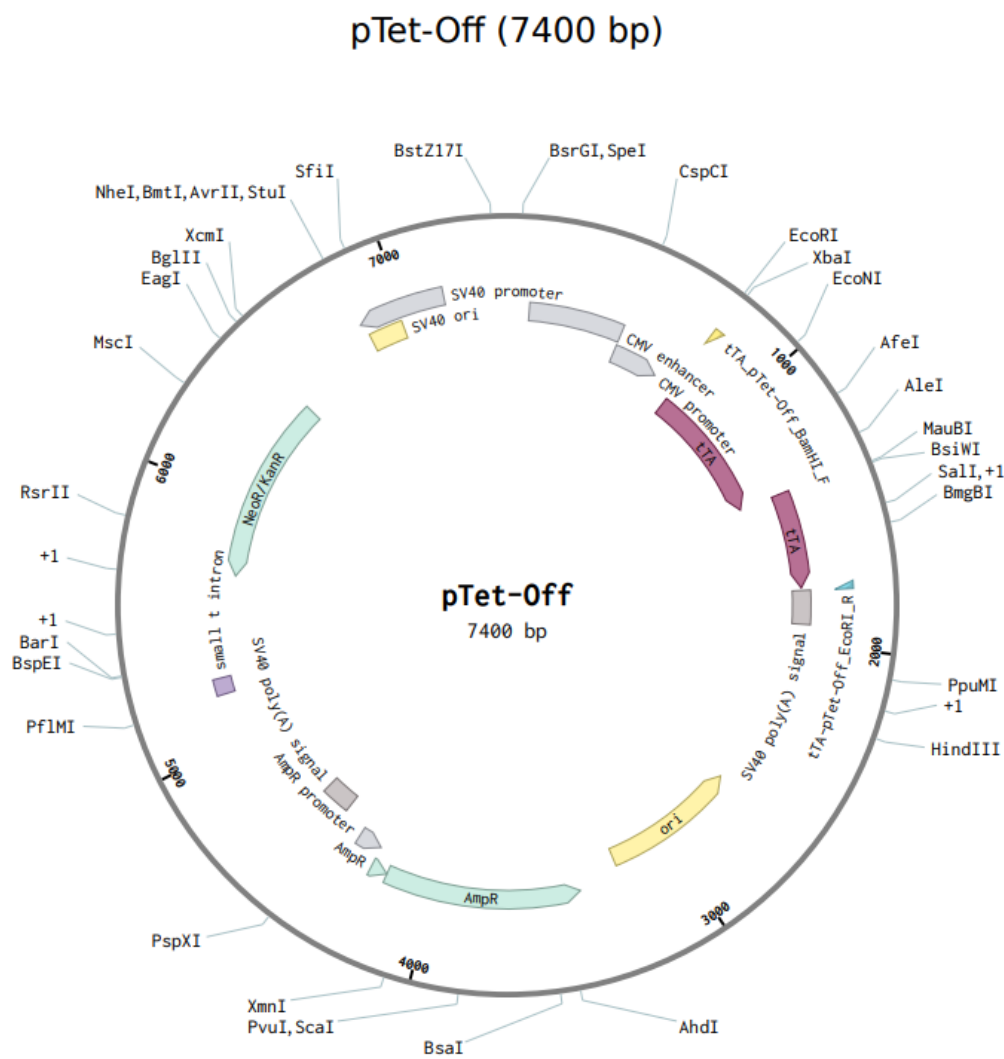
<https://genome.ucsc.edu/index.html> (2018)

<http://chopchop.cbu.uib.no/index.php> (2018)

LISA 1. pX458-NotI plasmiid

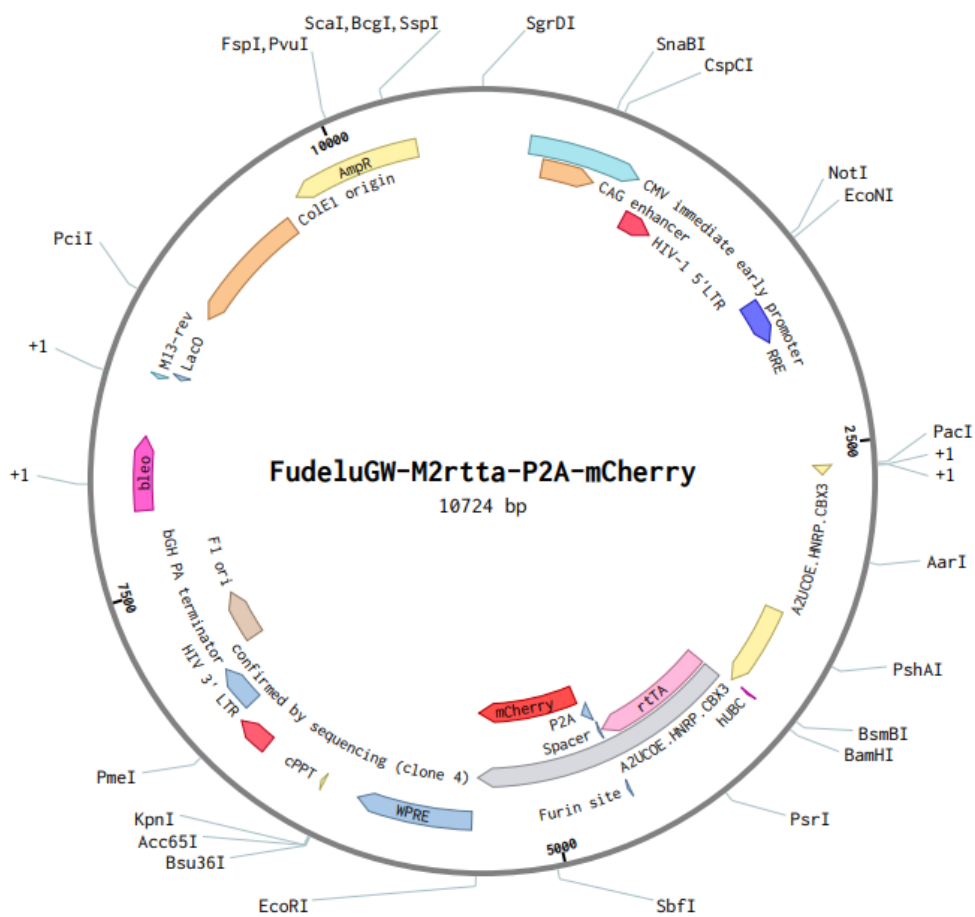


LISA 2 . pTet-OFF plasmid

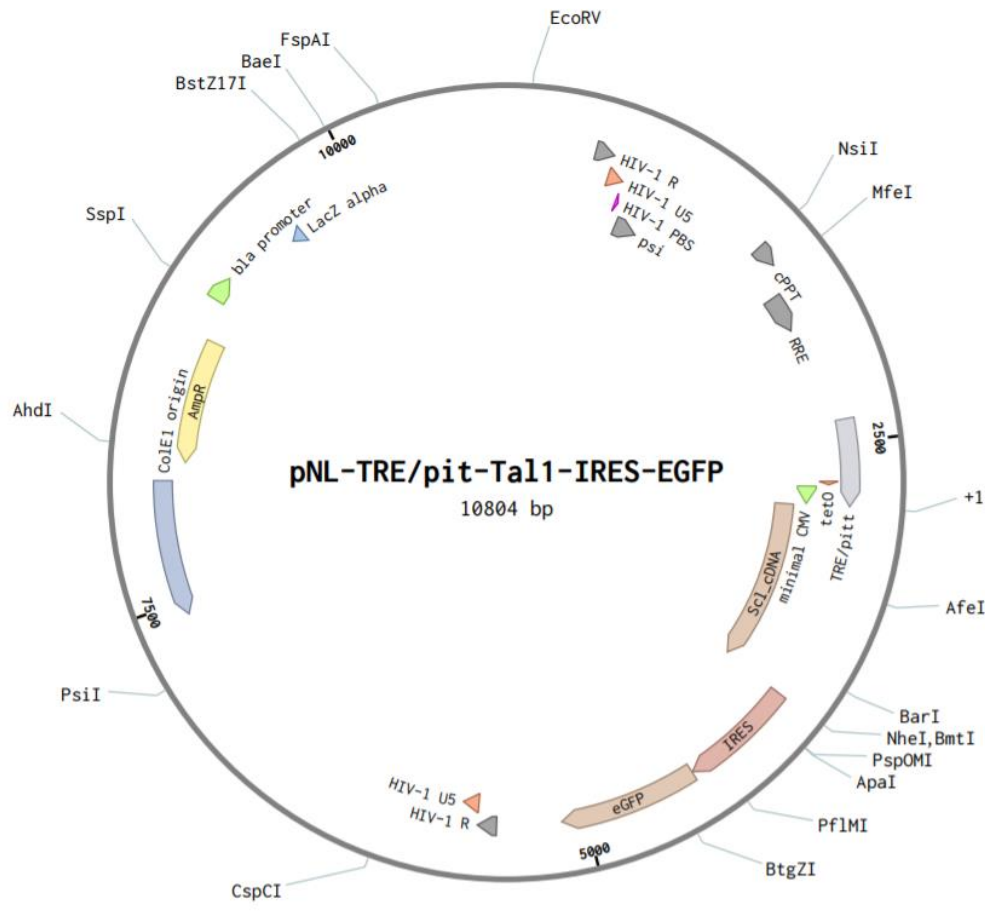


LISA 3. FudeluGW-M2rtta-P2A-mCherry plasmid

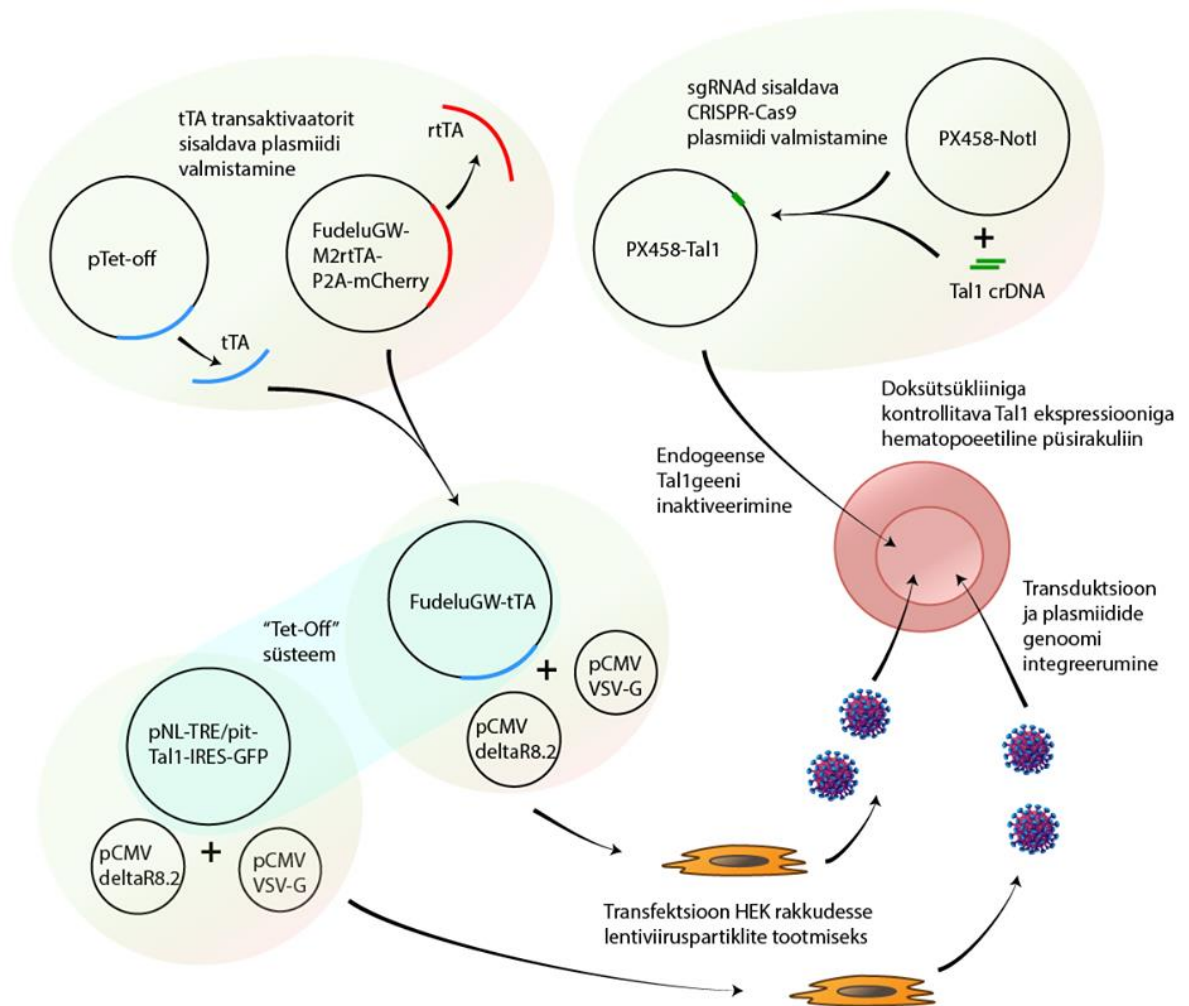
FudeluGW-M2rtta-P2A-mCherry (10724 bp)



LISA 4. pNL-TRE/pit-Tal1-IRES-EGFP plasmid



LISA 5. Transkripsioonifaktori Tal1 uurimiseks loodava püsirakuliini loomise plaan.



LIHTLITSENTS

Mina, Mare Vahtre,

(sünnikuupäev 18.04.1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Tal1 transkriptsioonifaktori uurimiseks vajalike CRISPR-Tal1 plasmidi ja „Tet-OFF“ süsteemi konsrtueerimine“, mille juhendaja on Tõnis Org, *PhD*,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018

